利用 mtDNA COⅠ基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型

罗　晨[1]，姚　远[2]，王戎疆[2]，阎凤鸣[2*]，胡敦孝[3]，张芝利[1]

（1. 北京市农林科学院植保环保所，北京　100089；2. 北京大学生命科学学院，北京　100871；
3. 中国农业大学植物保护学院，北京　100093）

摘要：利用 mtDNA COⅠ基因片段作标记，采用序列分析的方法，从分子生态学的角度研究了近年来在我国暴发危害的烟粉虱 *Bemisia tabaci* 5 个种群（北京一品红种群，广州甘蓝种群，西安一品红种群，北京西红柿种群和新疆吐鲁番棉花种群）的生物型。在 5 个种群的基因片段上，截取与 Texas-B 型相应的 720 bp 的序列分析，结果表明所测序列中只有 2 个碱基与 Texas-B 型不同，序列相似性为 99.7%；在西安一品红种群和新疆吐鲁番棉花种群的原序列中截取与 Arizona-B 型序列相应的 423 bp 片段，分析表明这两个种群与 AZB3 型属于同一个单倍型。因此，我国烟粉虱 5 个实验种群的生物型与 Texas-B 型和 Arizona-B 型种群为同一生物型“B”。

关键词：烟粉虱；PCR；mtDNA；COI 基因序列；生物型

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）06-0759-05

The use of mitochondrial cytochrome oxidase Ⅰ（mt COⅠ）gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci*（Gennadius）in China

LUO Chen[1]，YAO Yuan[2]，WANG Rong-Jiang[2]，YAN Feng-Ming[2*]，HU Dun-Xiao[3]，ZHANG Zhi-Li[1]（1. Institute of Plant and Environmental Protection，Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences，Beijing　100089，China；2. College of Life Sciences，Peking University，Beijing　100871，China；3. Department of Entomology，China Agricultural University，Beijing　100094，China）

Abstract: Mitochondrial cytochrome oxidase Ⅰ（mt COⅠ）（～830 bp）gene sequences were utilized as markers to identify biotypes of 5 populations of *Bemisia tabaci* in China. Of the 720 characters examined for COⅠ sequences，only 2 bases exhibited divergence and overall similarity was 99.7%. Examination of 423 characters in populations from Xi'an and Tulufan revealed that these two populations were of the same haplotype as AZB3. The results indicated that all 5 populations were of the B-biotype.

Key words: *Bemisia tabaci*；PCR；mtDNA；COⅠ sequence；biotype

烟粉虱 *Bemisia tabaci*（Gennadius）是热带和亚热带地区主要害虫之一，南美洲、欧洲、非洲、亚洲、大洋洲的很多国家和地区都有分布（Mound and Halsey，1978）。近年来，烟粉虱大范围扩散，已成为一种世界范围的灾害性害虫。烟粉虱寄主范围广泛，在行为、危害习性和传毒能力等方面又分化为多种生物型（Brown *et al*.，1995）。由于不同的生物型在危害、习性和对化学农药的抗性上有许多差异（Costa *et al*.，1993；Byrne and Devonshire，1993），因此，生物型的鉴定对于烟粉虱的预测预报、综合防治（如药剂选择、天敌引进和筛选等）有非常重要的意义。

目前在全世界危害最严重的是 B 型烟粉虱。Bellows 等（1994）在形态上对 B 型烟粉虱和 A 型烟粉虱进行了描述：B 型烟粉虱蛹壳上多数无第四根亚前缘毛，其尾气管孔口的蜡缘饰宽度一般不超出尾刚毛；而 A 型烟粉虱则相反。尽管 B 型很难通过形态确认，但它在生物学特征上和原来泛指的烟粉虱（A 型）存在着明显的差异（Perring *et al*.，1993；Brown *et al*.，1995）：（1）B 型烟粉虱在西葫芦上危害能引起银叶病（squash silverleaf disorder），而 A 型却不能；（2）B 型比 A 型有更广泛的寄主植

基金项目：国家科技攻关项目；北京市自然科学基金项目（6022007）；国家“973”项目
作者简介：罗晨，女，1970 年 10 月生，博士，助理研究员，从事害虫生物防治研究，E-mail：lc1010@163.net
＊通讯作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2001-11-12；接受日期 Accepted：2002-07-24

物，保守估计已超过500种；（3）B型比A型取食更多的植物汁液，分泌更多的蜜露；（4）B型比A型产卵量更大；（5）B型对某几种杀虫剂有更高的抗药性，如氯氰菊酯等菊酯类农药。这些差别使得B型更易造成猖獗危害，发生后更难于控制。

1991年，B型烟粉虱在美国南加州和亚利桑那州大发生，据估算当年烟粉虱在美国部分地区危害所造成的损失超过了5亿美元（Perring *et al*.，1993）。烟粉虱在我国很早就存在（阎凤鸣，1991），但没有造成大的危害；近两三年来烟粉虱开始在我国华北地区和其他地区大发生（张芝利，2000），其镜检特征和危害西葫芦造成的银叶症状与国外报道的B型烟粉虱相似，怀疑我国最近发生的烟粉虱属于B生物型；但由于缺少分子生物学及遗传学方面的证据，尚不能确切断定我国烟粉虱的生物型。烟粉虱的不同生物型在外部形态上难以区分，因而，分子系统学的技术就成为鉴定烟粉虱不同生物型的有效手段。本项研究试图利用mtDNA COⅠ基因片段作标记，将所得序列与GenBank已有序列作比较，从而为鉴定在我国暴发危害的烟粉虱生物型和确定其来源提供分子生物学的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

5个地理区域或寄主植物上的烟粉虱种群，经室内镜检10头以上4龄若虫（伪蛹）的形态特征，确定为烟粉虱后，再进一步做分子生物学试验。其编号、寄主、采集地、采集时间见表1。

表1 烟粉虱样品的来源

Table 1 Source of *Bemisia tabaci*

编号 No.	寄主 Host-plant	采集地 Location	采集时间 Date
11	一品红 poinsettia	北京 Beijing	2001.3
12	甘蓝 *Brassica oleracea*	广州 Guangzhou	2001.3
13	一品红 poinsettia	西安 Xi'an	2001.1
15	西红柿 tomato	北京 Beijing	2001.2
23	棉花 cotton	新疆吐鲁番 Tulufan, Xinjiang	1999. 10

1.2 DNA提取

取粉虱个体1头，置于滴有20 μL碱裂解液（50 mmol/L Tris-HCl（pH 8．0），20 mmol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，1% SDS）的封口膜上，用0.2 mL的离心管底部将粉虱充分研磨匀浆，将匀浆液吸入1.5 mL的Eppendorf管中。向管中加入1 μL 20 mg/mL的蛋白酶K，充分混匀后，置于60℃水浴锅中3 h，中途追加1 μL蛋白酶K。随后每管加入178 μL的ddH_2O，100℃下水浴5 min。取100 μL提取液，加入两倍体积的预冷无水乙醇，冰浴2 h。以12 000 r/min离心20 min，DNA沉淀室温晾干。每管加入20 μL缓冲液（pH 8.0），溶解后即可用于PCR反应。

1.3 PCR反应条件

所用引物为通用引物C1-J-2195（5′-TTGATTTTTTG GTCATCCAGAAGT-3′）和L2-N-3014（5′-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3′）。扩增产物是COⅠ基因3′末端的部分序列，大小为840 bp左右（Simon *et al*.，1994）。

PCR反应系统体积为20 μL，含1U Taq酶，反应缓冲液，2.5 mmol/L $MgCl_2$，0.25 mmol/L dNTP，2 mg/mL BSA，50 ng C1-J-2195，50 ng L2-N-3014，模板DNA为2 μL。反应体系于94℃预变性5 min后，进行35个如下循环：94℃变性1 min；50℃退火1 min；72℃延伸1 min。循环结束后72℃延伸5 min。反应产物置于4℃冰箱保存。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

PCR产物以1.6%琼脂糖凝胶电泳分离，EB染色后在紫外透视仪上观察，记录结果。

1.5 PCR产物回收纯化

在电泳中检测到目标片段后，进行产物纯化。若扩增出单一的目标片段，用Promega DNA纯化系统直接进行纯化。若除了目标片段外还有杂带，则先用低熔点琼脂糖分离后再用Promega DNA纯化系统回收DNA片段。

1.6 序列测定与分析

纯化后的样品送至上海博亚生物技术有限公司测序，测序所用为ABI-377测序仪及配套的BigDye Terminator试剂盒。每个样品的测序分别从序列的2195引物端和3014引物端进行。得到的测序结果用CLUSTALX（1.8）进行排序分析，比较所得序列之间的差异，并与GenBank中烟粉虱COⅠ部分序列进行比较。

2 结果与分析

2.1 PCR产物检测

为保证实验的可重复性，在提取DNA时，对北京西红柿种群的个体进行了水浴不同时间的效果试验，并对PCR产物进行电泳检测。结果证明，

本实验方法重复性好，水浴 2 h 提取的烟粉虱单个个体的 DNA 足以进行 PCR 反应，其产物大小在 831 bp 和 941 bp 之间，与预计中的产物大小相近。可以初步判定该产物是所需的目的片段。

2.2　测序结果分析

所有样品测序均得到约 800 bp 的片段，为与烟粉虱已知的 COⅠ序列（美国 Texas-B 型，GenBank Acc. No.: AF164675）作比较，分别从每个片段中截取 720 bp 的序列进行分析（图 1）。可以看出，5 条 720 bp 的序列在所有的位点上都是一样的。各个碱基的含量为：182 A，89 C，139 G，310 T，A + T 的含量为 68.3%。这条序列编码 240 个氨基酸，是细胞色素氧化酶第一亚基—OH 端的一部分。北京一品红上的烟粉虱种群 COⅠ基因部分序列及其编码的氨基酸序列分别见图 2。

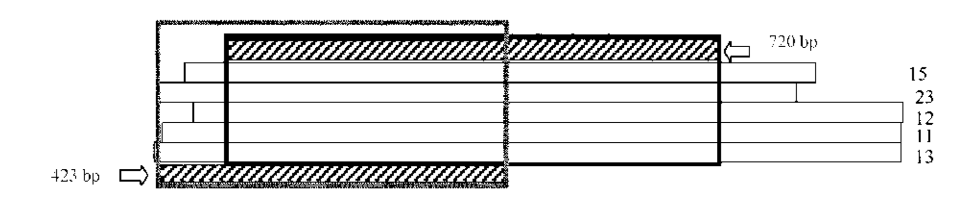


图 1　我国烟粉虱 5 个种群与 Texas-B（720 bp）、Arizona-B（423 bp）序列比较图

Fig. 1　The comparison of mt COⅠ fragments (bases) among Texas-B (720 bp), Arizona-B (423 bp) and 5 populations of *B. tabaci* in China

```
1   GTT TCT CAT CTA ATC AGC AGT GAG GCT GGA AAA TTA GAG GTA TTT GGA AGG TTG GGT ATA
     V   S   H   L   I   S   S   E   A   G   K   L   E   V   F   G   S   L   G   I
61  ATT TAT GCT ATA TTG ACT ATT GGT ATT CTA GGG TTT ATT GTT TGA GGT CAT CAT ATA TTC
     I   Y   A   M   L   T   I   G   I   L   G   F   I   V   W   G   H   H   M   F
121 ACA GTT GGA ATA GAT GTA GAT ACT CGA GCT TAT TTC ACT TCA GCC ACT ATA ATT ATT GCT
     T   V   G   M   D   V   D   T   R   A   Y   F   T   S   A   T   M   I   I   A
181 GTT CCC ACA GGA ATT AAA ATT TTT AGT TGG CTT GCT ACT TTG GGT GGA ATA AAG TCT AAT
     V   P   T   G   I   K   I   F   S   W   L   A   T   L   G   G   M   K   S   N
241 AAA TTA AGG CCT CTT GGC CTT TGA TTT ACA GGA TTT TTA TTT TTA TTT ACT ATA GGT GGG
     K   L   S   P   L   G   L   W   F   T   G   F   L   F   L   F   T   M   G   G
301 TTA ACT GGA ATT ATT CTT GGT AAT TCT TCT GTA GAT GTG TGT CTG CAT GAC ACT TAT TTT
     L   T   G   I   I   L   G   N   S   S   V   D   V   C   L   H   D   T   Y   F
361 GTT GTT GCA CAT TTT CAT TAT GTT TTA TCA ATA GGA ATT ATT TTT GCT ATT GTA GGA GGA
     V   V   A   H   F   H   Y   V   L   S   M   G   I   I   F   A   I   V   G   G
421 GTT ATC TAT TGA TTT CCA CTA ATC TTA GGT TTA ACC TTA AAT AAT TAT AGA TTG GTG TCT
     V   I   Y   W   F   P   L   I   L   G   L   T   L   N   N   Y   S   L   V   S
481 CAA TTT TAT ATC ATG TTT ATA GGA GTA AAT TTA ACT TTT TTT CCT CAG CAT TTT CTT GGT
     Q   F   Y   I   M   F   I   G   V   N   L   T   F   F   P   Q   H   F   L   G
541 TTA GGG GGA ACG GGA AGG ATA TAT TCA GAT TAT GCT GAT TGC TAT CTA GTA TGA AAT AAA
     L   G   G   M   P   R   R   Y   S   D   Y   A   D   C   Y   L   V   M   N   K
601 ATT TCT TCT GCG GGA AGG ATT CTG AGT ATT ATT TCT GTT ATT TAT TTT TTA TTT ATT GTT
     I   S   S   A   G   S   I   L   S   I   I   S   V   I   Y   F   L   F   I   V
661 TTA GAA TCC TTT CTT CTT CTG CGG TTA GTA AGA TTT AAG CTT GGT GTA AGT AGG CAT CTA
     L   E   S   F   L   L   L   R   L   V   S   F   K   L   G   V   S   S   H   L
```

图 2　北京一品红烟粉虱种群 COⅠ基因的部分序列和对应的氨基酸序列

Fig. 2　mt COⅠ bases and amino acid sequence of *Bemisia tabaci* from poinsettia in Beijing

将图2的序列与Texas-B型的序列比较，发现仅2个碱基有区别（在图2中以方框标出）。在第533号位点上发生从C→T的转换，在605号位点上发生从T→C的转换。这两个转换均位于第二位密码子，它们造成了相应的氨基酸的变化，即533号位点从丝氨酸（Ser）变为苯丙氨酸（Phe），605号位点是从Phe为Ser。另外，13号和23号样品的原序列中可截取到与Arizona-B（AZB）型序列相应的423 bp片段。样品比较后发现，对于这段423 bp的片段，我国的这两个种群与AZB3型（GenBank Acc. No.: AF110696）是完全一样的。

3 讨论

Kirk等（2000）比较了全世界不同种群烟粉虱COⅠ基因3′端700～720 bp的序列，并利用最大简约法（maximum parsimony）构建了烟粉虱种群的系统聚类树。他们发现来自美国的亚里桑那、佛罗里达、得克萨斯和以色列的4个B型烟粉虱种群组成一支，它们的序列互相之间有99.4%～99.7%一致性，而这一支和与其亲缘关系最近的苏丹、西班牙一支的序列一致性为94%～96%。在B型的这一支内还有以色列的寄主为Lantata的种群，它与同支内的4个种群亲缘关系略远，相似性为98.1%～98.3%，属于近似于B型的一种。

计算本文中所得到的序列与Texas-B型间的一致性（配对比较相同的位点数除以总位点数），得到（720－2）/720 ＝99.7%。可见该序列与Texas-B型之间的差异是非常小的，这在Kirk等（2000）所研究的4个B型种群内部差异（99.4%～99.7%）的范围之内，说明我们所研究的烟粉虱种群属于B型的一种。由于无法得到除Texas-B型外的其余B型种群的序列数据，无法断定中国-B型（简写为CH-B）的序列属于一种新的单倍型（haplotype）还是和已有的某种B型的序列一致。

Frohlich等（1998）曾以同样的引物扩增COⅠ基因部分序列，用以研究烟粉虱种群之间的系统发育。他们所用的片段长度为422～423 bp。我国的13号和23号的原序列与Arizona（AZB）型种群的AZB3型属于同一个单倍型，而与同为AZB种群中的另一个单倍型AZB5.1（GenBank Acc. No.: AF110697）只相差1个碱基。可见，CH-B型与AZB种群的差异在AZB种群内部差异的范围之内，这也为确定该烟粉虱为B型提供了证据。

据研究（Frohlich *et al*., 1998），全世界B型烟粉虱的起源在东非、中东以及阿拉伯半岛地区，他们分析认为在美国危害猖獗的B型是从外国传入的。Brown等（1995）认为，借助一品红或其他花卉的调运进行扩散是烟粉虱在全世界范围内传播的主要方式。在我国，据陈连根报道（1997），自1994年上海某单位从国外引进一品红后，烟粉虱在上海地区的园林植物上大发生，用药难以控制。在新疆地区，烟粉虱首先也是在乌鲁木齐市内的一品红上被发现（赵莉等，2000）。

Kirk等（2000）得到的中国烟粉虱样品HC-China（GenBank Acc. No.: AF164671）和我们实验所测得的福建本地种群结果（详细资料将另文报道）表明：这两个种群与B型烟粉虱在分子标记上（397 bp）的一致性分别为84.05%和87.02%。本实验通过比较COⅠ基因序列，显示了所测的采自北京、广东、陕西、新疆4个不同地理区域的5个烟粉虱种群均为B型，这些种群分属相隔很远的地理区域，如果我国B型烟粉虱属于本地起源，正如HC-China和福建本地种群一样，它们应该与别的B型种群积累足够多的差异。因此，我们可以初步推测我国的B型烟粉虱是近几年入侵的外来种群。它们有可能是由外国引入到我国多个地区，随花木的调运在我国不同地区间互相传播，并从花木上扩散到周围的农业、园艺业生产区，并暴发成灾。但是我国幅员辽阔，地理情况复杂，再加上以往资料的缺乏，尚需做进一步的工作才能得出有说服力的结论。

参 考 文 献（References）

Bellows T S, Perring T M, Gill R J, Headrick D H, 1994. Description of a species of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 87 (2): 195－206.

Brown J K, Frohlich D R, Rosell R C, 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 511－534.

Byrne F J, Devonshire A L, 1993. Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 45: 34－42.

Chen L G, 1997. The damage and morphological variations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) on ornamental plants. *Journal of Shanghai Agricultural College*, 15 (3): 186－189, 208. [陈连根，1997. 烟粉虱在园林植物上危害及其形态变异. 上海农学院学报，15 (3): 186－189，208]

Costa H S, Brown J K, Sivasupramanniam S, Bird J, 1993. Regional distri-

bution, insecticide resistance, and reciprocal crosses between the A and B biotypes of *Bemisia tabaci*. *Insect Sci. Appl.*, 14: 255－266.

Frohlich D R, Torres-Jerez I, Bedford I D, Markham P G, Brown J K, 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 8 (10): 1 683－1 691.

Kirk A A, Lacey L A, Brown J K, Ciomperlik M A, Goolsby J A, Vacek D C, Wendel L E, Napompeth B, 2000. Variation in the *Bemisia tabaci*. l. species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 317－327.

Mound L A, Halsey S H, 1978. Whitefly of the World. British Museum and John Wiley & Sons, London. 1－340.

Perring T M, Cooper A D, Rodriguez R J, Farrar C A, Bellows T S, 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259: 74－77.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 87 (6): 651－701.

Yan F M, 1991. The morphological variations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Beijing Agricultural College*, 6 (1): 68－71. [阎凤鸣，1991. 粉虱的形态变异. 北京农学院学报，6 (1): 68－71]

Zhang Z L, 2000. Some thoughts to the outbreaks of tobacco whitefly. *Beijing Agricultural Sciences*, *A Special Issue on Tobacco Whitefly* (*Bemisia tabaci*): 1－3. [张芝利，2000. 关于烟粉虱大发生的思考. 北京农业科学，(烟粉虱专集): 1－3]

Zhao L, Zhang R, Xiao Y, Cui Y Y, Huang W, 2000. The important pest-tobacco whitefly was found in cotton field in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 1: 27－28. [赵莉，张荣，肖艳，崔元□，黄伟，2000. 危害棉花的害虫烟粉虱在新疆发现. 新疆农业科学，1: 27－28]